

PCT/JP03/07910

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

23.06.03

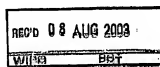
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 2 年   6 月 2 4 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 2 - 1 8 3 2 5 9  
Application Number:  
[ST. 10/C]:      [ J P 2 0 0 2 - 1 8 3 2 5 9 ]

出 願 人      シスメックス株式会社  
Applicant(s):

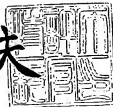


PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年   7 月 2 5 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号   出証特 2 0 0 3 - 3 0 5 9 0 8 4

【書類名】 特許願

【整理番号】 1-2002-017

【提出日】 平成14年 6月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/48

【発明の名称】 白血球の分類計数方法

【請求項の数】 8

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス  
株式会社内

【氏名】 辻 智悠

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス  
株式会社内

【氏名】 水上 利洋

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス  
株式会社内

【氏名】 小西 綾

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス  
株式会社内

【氏名】 森 悠丞

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス  
株式会社内

【氏名】 中澤 幸恵

【特許出願人】

【識別番号】 390014960

【氏名又は名称】 シスメックス株式会社

【代理人】

【識別番号】 100065248

【弁理士】

【氏名又は名称】 野河 信太郎

【電話番号】 06-6365-0718

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014203

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9800839

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 白血球の分類計数方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) 血液学的試料を溶血剤と処理して赤血球を溶解させ、かつ幼若白血球以外の白血球に損傷を与え、得られた試料中の細胞を、少なくとも成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球との間に蛍光強度の差異を生じうる蛍光色素で染色する工程、

(2) 染色された細胞を含む試料をフローサイトメータに導入して、各細胞について、散乱光と蛍光とを測定する工程、

(3) 散乱光ピークの強度差と散乱光幅の差を利用して、凝集細胞および凝集血小板以外の全ての細胞を分類する工程、

(4) 工程(3)で分類された細胞の散乱光の強度差と蛍光の強度差とを利用して、成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球を分類計数する工程からなる白血球の分類計数方法。

【請求項2】 さらに、DNA量異常白血球数と成熟白血球数または幼若白血球数とから、DNA量異常白血球に対する成熟白血球または幼若白血球の割合を算出する工程からなる請求項1に記載の方法。

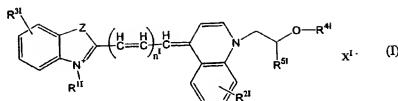
【請求項3】 さらに、成熟白血球数と幼若白血球数とから、成熟白血球に対する幼若白血球の割合を算出する工程からなる請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 工程(2)で異なる種類の散乱光をさらに測定し、さらに、工程(4)で得られた成熟白血球についての該散乱光の強度差と蛍光の強度差を用いて、成熟白血球を少なくとも3つに分類計数する工程からなる請求項1~3のいずれか1つに記載の方法。

【請求項5】 工程(2)で異なる種類の散乱光をさらに測定し、さらに、工程(4)で得られた幼若白血球についての該散乱光の強度差と蛍光の強度差を用いて、幼若白血球を少なくとも2つに分類計数する工程からなる請求項1~4のいずれか1つに記載の方法。

【請求項6】 蛍光色素が、式(I)：

## 【化1】



(式中、R<sup>1i</sup>は水素原子または低級アルキル基；R<sup>2i</sup>及びR<sup>3i</sup>は水素原子、低級アルキル基または低級アルコキシ基；R<sup>4i</sup>は水素原子、アシル基または低級アルキル基；R<sup>5i</sup>は水素原子または置換されてもよい低級アルキル基；Zは硫黄原子、酸素原子、または低級アルキル基で置換された炭素原子；nは1または2；X<sup>-</sup>はアニオンである。)で表される化合物

ならびにエチジウムブロマイド、プロビジウムアイオゲイド、エチジウム-アクリジンヘテロダイマー、エチジウムジアジド、エチジウムホモダイマー-1、エチジウムホモダイマー-2、エチジウムモノアジド、TOTO-1、TO-PRO-1、TOTO-3およびTO-PRO-3からなる群から選択される請求項1～5のいずれかひとつに記載の方法。

【請求項7】 溶血剤が以下の成分：

- (1) ポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤
- (2) 血球の細胞膜に損傷を与え縮小化するための可溶化剤
- (3) アミノ酸および
- (4) 液のpHを5.0～9.0、浸透圧を150～600mOsm/kgにする緩衝液からなる請求項1～6のいずれかひとつに記載の方法。

【請求項8】 測定する散乱光が、前方低角散乱光、前方高角散乱光および側方散乱光から選ばれる少なくとも2つである請求項1～7のいずれかひとつに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は白血球の分類計数方法に関する。より詳細には、フローサイトメータ

を利用した血液学的試料の白血球、ことにDNA量異常白血球の分類計数方法に関する。

#### 【0002】

【従来技術及び発明が解決しようとする課題】

臨床検査の分野において、DNA量異常白血球や幼若白血球の分類計数を行うことにより、疾患の診断を行う上で極めて有用な情報を得ることができる。例えば、通常、正常な末梢血中の白血球には、リンパ球、単球、好塩基球、好酸球、好中球の5つが存在し、そのDNA量は一定である。しかし、例えば、ウイルス疾患やリンパ系白血病などの血液疾患ではDNA量異常白血球が出現し、骨髄系白血病などの血液疾患では幼若白血球が出現する。

#### 【0003】

従来、DNA量異常白血球を測定するには、比重遠心分離により白血球から分離した単核球（リンパ球および単球）または末梢血などと核酸染色色素と溶血剤とを混合して染色した後に、測定する必要があった。比重遠心分離による単核球分離は、操作が煩雑であるため、分離が完了するまでに1時間以上要する。さらに単核球または末梢血を核酸染色色素および溶血剤と混合し染色するのに30分以上要する。

#### 【0004】

また幼若白血球を分類計数するには、血液の塗抹標本を作製し、適当な染色を施した後に顕微鏡で観察しながら、分類計数するのが一般的であった。一方、近年、フローサイトメータの原理を応用した種々の全自動血球分類計数装置が提供されている。しかしながら、これらの装置は、正常な白血球を高精度に分類計数することができるが、凝集血小板や凝集細胞などの影響を大きく受け、幼若白血球を確実に検出し、分類することはできなかった。

一方、幼若白血球を生きた状態に保持し、その他の白血球に損傷を与える溶血剤で処理した後に、損傷を受けた細胞を染色できる蛍光色素で染色し、得られた血球の散乱光と蛍光を測定することにより、幼若白血球と正常白血球を同時に、分類計数できることが報告されている（特開平10-206423号）。しかしこの方法では、DNA量異常白血球と凝集血小板および凝集細胞を分別すること

ができず、DNA量異常白血球を正確に分類計数することができなかった。

したがって、DNA量異常白血球、さらに同時に幼若白血球を測定するための迅速、簡便かつ高精度に測定可能な方法が望まれている。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明によれば、幼若白血球を生きた状態に保持し、その他の白血球に損傷を与える溶血剤で処理した後に、損傷を受けた細胞を染色できる蛍光色素で染色し、得られた血球の散乱光と蛍光を測定し、散乱光ピークの強度差と散乱光幅の差を用いることにより、DNA量異常白血球、さらに同時に幼若白血球および成熟白血球を分類計数することが可能な方法を提供する。

従って、本発明によれば、

- (1) 血液学的試料を溶血剤と処理して赤血球を溶解させ、幼若白血球以外の白血球に損傷を与え、かつ得られた試料中の細胞を、少なくとも成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球との間に蛍光強度の差異を生じうる蛍光色素で染色する工程、
- (2) 染色された細胞を含む試料をフローサイトメータに導入して、各細胞について、散乱光と、蛍光とを測定する工程、
- (3) 散乱光ピークの強度差と散乱光幅の差を利用して、凝集細胞および凝集血小板以外の全ての細胞を分類する工程、
- (4) 工程(3)で分類された細胞の散乱光の強度差と蛍光の強度差を利用して、成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球を分類計数する工程からなる白血球の分類計数方法が提供される。

#### 【0006】

##### 【発明の実施の形態】

本発明でいう血液学的試料は、末梢血液、骨髓穿刺液、尿等で採取した試料など、白血球を含む体液試料をいう。

本発明でいう成熟白血球とは、成熟したリンパ球、単球、顆粒球のことをいう。

DNA量異常白血球とは、通常のDNA量より多い、または少ないDNA量をも

った白血球のことをいう。ただし、本発明においては、DNA量異常白血球とは、通常のDNA量より多いDNA量をもった白血球のことを指す。

本発明でいう幼若白血球とは、通常骨髓に存在し、末梢血に出現しない未成熟な白血球をいう。例えば、骨髓芽球、前骨髓球、骨髓球、後骨髓球などという。前骨髓球、骨髓球、後骨髓球については、まとめて顆粒球系幼若球とすることもある。さらには、芽球以前の分化段階の細胞である、骨髓系幹細胞 (CFU-GEMM)、好中球・マクロファージコロニー形成細胞 (CFU-GM)、好酸球コロニー形成細胞 (CFU-EOS) 等の白血球系の造血前駆細胞も本発明の幼若白血球の範囲に含む。

#### 【0007】

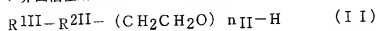
本発明では、血液学的試料を溶血剤と処理し、赤血球を溶解させる。一方、この処理により、幼若白血球は溶解も損傷もせず、成熟白血球及びDNA量異常白血球は損傷される。特定の組成の溶血剤を細胞に作用させた場合、作用機序は明確ではないが、特定の細胞の細胞膜脂質構成成分の一部を抽出(引き抜く)することにより、細胞膜に特定の物質が通過できるだけの細孔をあける。これを損傷と呼ぶ。この結果、特定の細胞内に色素分子が入り込み染色することができる。従って、損傷を与えられた成熟白血球およびDNA量異常白血球は、染色に好適な状態である。一方、損傷をうけない幼若白血球は、色素の透過を可能とするだけの細孔があげられないために、色素で染色されない。さらに成熟白血球及びDNA量異常白血球は、細胞に含まれるDNA量によって色素の結合量が異なっている。従って、そのような細胞を色素で染色すると、DNA量に応じて染色される色素の量が異なり、染色された細胞の蛍光強度が異なる。例えば、DNA量が成熟白血球の2倍量のDNA量異常白血球の場合、結合する色素の量は正常な成熟白血球の2倍となり、この細胞は成熟白血球より強い蛍光を発する。この結果、成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球との間に蛍光強度の差異が生じる。

#### 【0008】

本発明の工程(1)で用いる溶血剤は、界面活性剤、可溶化剤、アミノ酸および緩衝液とからなるのが好ましい。

## 【0009】

界面活性剤としては種々のものを使用できるが、ポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤が好ましい。具体的には、以下の式(I I)：



(式中、 $R^{1II}$ はC<sub>9-25</sub>のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基； $R^{2II}$ は、-O-

## 【化2】



または-COO-； $n^{II}$ は10～40である。)を有するものを用いることができる。

## 【0010】

C<sub>9-25</sub>のアルキル基としては、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル等が挙げられる。C<sub>9-25</sub>のアルケニル基としては、ドデシニル、テトラデシニル等が挙げられる。C<sub>9-25</sub>のアルキニル基としては、ドデシニル、ウンデシニル、ドデシニル等が挙げられる。

さらに具体的には、ポリオキシエチレン(20)ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン(15)オレイルエーテル、ポリオキシエチレン(16)オレイルエーテルが好適である。

## 【0011】

界面活性剤は水溶液の形態で用いることができる。例えばポリオキシエチレン系ノニオン性界面活性剤の水中濃度については、使用する界面活性剤の種類によって異なるが、前述のポリオキシエチレン(20)ラウリルエーテルでは、0.1～2.0g/l(好ましくは0.5～1.5g/l)、ポリオキシエチレン(15)オレイルエーテルでは、1～9g/l(好ましくは3～7g/l)、ポリオキシエチレン(16)オレイルエーテルでは、5～50g/l(好ましくは15～35g/l)の範囲で使用できる。ポリオキシエチレン系ノニオン性界面活性剤は、疎水性基の炭素数が同じであれば、 $n^{II}$ の数が小さくなるほど細胞を損

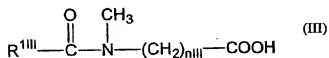
傷する力が強く、 $n_{II}$ が大きくなるほど弱くなる。また、 $n_{II}$ の数が同じであれば、疎水性基の炭素数が小さくなるにつれて細胞を損傷する力が強くなる。その点を考慮し、上記の値を目安にして、必要な界面活性剤濃度は実験により簡単に求めることができる。

## 【0012】

可溶化剤は、血球の細胞膜に損傷を与え、縮小化するために用いる。具体的には、以下：

式(III)：

【化3】



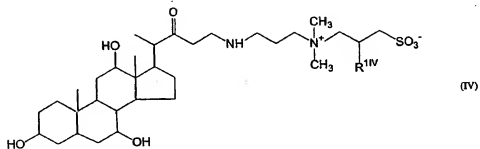
(式中、 $R^{III}$ は $C_{10-22}$ のアルキル基； $n_{III}$ は1～5である。)

のサルコシン誘導体あるいはその塩、

## 【0013】

式(IV)：

【化4】



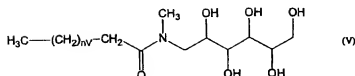
(式中、 $R^{IV}$ は水素原子または水酸基。)

のコール酸誘導体、および

## 【0014】

式(V)：

## 【化5】



(式中、 $n^V$ は5～7である。)

メチルグルカンアミドから選択される1またはそれ以上を用いることができる。

## 【0015】

$\text{C}_{10-22}$ のアルキル基としては、デシル、ドデシル、テトラデシル、オレイル等が挙げられる。

具体的には、N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム、ラウロイルメチルβ-アラニンナトリウム、ラウロイルサルコシン、CHAPS (3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート)、CHAPS O ([ (3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート)、MEGA8 (オクタノイル-N-メチルグルカミド)、MEGA9 (ノナノイル-N-メチルグルカミド)、MEGA10 (デカノイル-N-メチルグルカミド)等が好適に使用できる。

## 【0016】

可溶化剤の濃度は、サルコシン酸誘導体あるいはその塩では、0.2～2.0 g/L、コール酸誘導体では、0.1～0.5 g/L、メチルグルカンアミドでは、1.0～8.0 g/Lが好ましい。

その他に、可溶化剤としては、n-オクチルβ-グルコシド、シュークロースモノカプレートやN-ホルミルメチルロイシルアラニン等が使用でき、0.01～50.0 g/Lの濃度で用いるのが好ましい。

## 【0017】

また、アミノ酸は、幼若白血球の細胞質および細胞膜を固定化するために用いる。例えば、タンパク質を構成するアミノ酸を使用でき、グルタミン酸、バリンや、特にメチオニン、シスチン及びシステイン等のような含硫アミノ酸が好適であり、メチオニンが最も好適である。アミノ酸は、1～50 g/lの範囲で使用

でき、グルタミン酸の場合は8~12 g/lが好適であり、メチオニンの場合には、16~24 g/lが好適である。

#### 【0018】

緩衝液は、HEPES等のGood緩衝液やリン酸緩衝液等に水酸化ナトリウム等のようなpH調整剤を加え、必要があれば、塩化ナトリウムのような浸透圧調整剤をさらに加え、pHを5.0~9.0、浸透圧を150~600 mOsm/kgとするのが好ましい。

#### 【0019】

本発明の溶血剤としては、(1)ポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤；(2)血球の細胞膜に損傷を与え縮小化するための可溶化剤；(3)アミノ酸；および(4)液のpHを5.0~9.0、浸透圧を150~600 mOsm/kgにする緩衝液、電気伝導度を6.0~9.0 mS/cmにするための緩衝液からなる、特開平6-273413号に記載の溶血剤が好ましい。

#### 【0020】

本発明の成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球との間に蛍光強度の差異を生じうる蛍光色素は、損傷を与えた細胞または幼若白血球のうちいずれか一方を染色できるものであればよい。損傷を与えた細胞を染色する色素が好ましい。このような蛍光色素は、試料中の血球を含む細胞すべてを染色することができる。

損傷を与えた細胞を染色する色素とは、細胞核、特にDNAに対して特異性を有する色素あるいはRNAに特異性を有する色素が挙げられる。この目的には、いくつかのカチオン性色素が好適である。

#### 【0021】

一般的にカチオン性色素は、生きた細胞の細胞膜を通過し、細胞内構成成分を染色する。しかしながら、特定のカチオン性色素(例えば、エチジウムブロマイド、プロビジウムアイオダイド等)は、生細胞を通過せず、損傷細胞のみを染色することがよく知られている。

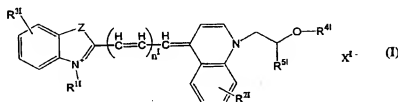
#### 【0022】

蛍光色素は、具体的には、前述のエチジウムブロマイド、プロビジウムアイオ

ダイド、さらにモレキュラープローブ社より販売されているエチジウム-アクリジンヘテロダイマー、エチジウムアジド、エチジウムホモダイマー-1、エチジウムホモダイマー-2、エチジウムモノアジド、TOTO-1、TO-PRO-1、TOTO-3、TO-PRO-3等が挙げられる。さらに光源としてHe-Ne、赤色半導体レーザーを使用する場合に好適な色素として、式(I)：

【0023】

【化6】



(式中、R<sup>11</sup>は水素原子または低級アルキル基；R<sup>21</sup>及びR<sup>31</sup>は水素原子、低級アルキル基または低級アルコキシ基；R<sup>41</sup>は水素原子、アシル基または低級アルキル基；R<sup>51</sup>は水素原子または置換されてもよい低級アルキル基；Zは硫黄原子、酸素原子または低級アルキル基で置換された炭素原子；n<sup>1</sup>は1または2；X<sup>1</sup>はアニオンである。)で示される色素が使用できる。

【0024】

上記構造式のR<sup>11</sup>における低級アルキル基は、C<sub>1-6</sub>の直鎖または分岐のアルキル基を意味し、メチル、エチル、プロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル基が挙げられ、中でもメチル基、エチル基が好ましい。

R<sup>21</sup>及びR<sup>31</sup>における低級アルキル基は上記と同様であり、低級アルコキシ基としては、C<sub>1-6</sub>のアルコキシ基を意味し、例えばメトキシ、エトキシ、プロポキシ等が挙げられ、中でもメトキシ基、エトキシ基が好ましい。

R<sup>41</sup>におけるアシル基は、脂肪族カルボン酸から誘導されたアシル基が好ましく、例えば、アセチル、プロピオニル等が挙げられ、中でもアセチル基が好ましい。また、低級アルキル基は上記と同様である。

【0025】

R5Iにおける低級アルキル基は上記と同様であり、置換されてもよい低級アルキル基とは、1～3個の水酸基、ハロゲン原子（フッ素、塩素、臭素またはヨウ素）等で置換されてもよい低級アルキル基を意味し、中でも1個の水酸基で置換されたメチル基、エチル基が好ましい。

Zにおける低級アルキル基とは上記と同様であり、Zとしては硫黄原子が好ましい。

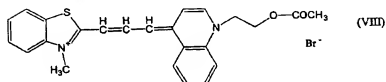
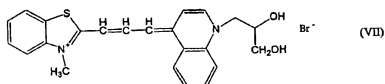
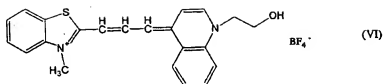
XI-におけるアニオンは、ハロゲンイオン（フッ素、塩素、臭素またはヨウ素イオン）、ハロゲン化ホウ素イオン（ $\text{BF}_4^-$ 、 $\text{BCl}_4^-$ 、 $\text{BBR}_4^-$ 等）、リン化合物イオン、ハロゲン酸素酸イオン、フルオロ硫酸イオン、メチル硫酸イオン、芳香環にハロゲンあるいはハロゲンをもつアルキル基を置換基として有するテトラフェニルホウ素化合物イオン等が挙げられる。中でも臭素イオンまたは $\text{BF}_4^-$ が好ましい。

#### 【0026】

上記色素としては単独または2以上を組み合わせ用いることができる。上記色素の具体的な例としては、好ましくは以下のような色素が挙げられるが、これにより本発明が制限されるものではない。

#### 【0027】

## 【化7】



## 【0028】

工程(1)の好ましい態様は、溶血剤と蛍光色素を含む溶液と血液学的試料を混合するものである。あるいは、蛍光色素をエチレングリコール等の水溶性有機溶媒に溶解しておき、使用時に溶血剤と混合してもよい。この場合、色素の保存安定性を高めることができるので好ましい。色素濃度は、使用する色素に応じて適宜決定できる。例えば、エチジウムブロマイドの場合、0.01～100mg/l、好ましくは、0.1～30mg/lが使用できる。

血液学的試料と蛍光色素を含む溶血剤の混合は、血液学的試料と、蛍光色素を含む溶血剤の比が1:10～1:1000、反応温度が20～40℃、反応時間が5秒～5分間で好適に実施できる。反応温度が高いときは反応時間を短くすることが好ましい。本発明において、幼若白血球を含む試料のDNA量を測定するには、幼若白血球を染色するために反応時間を長くすることにより可能となる。その場合の反応時間は、例えば10秒～5分間程度の反応時間を用いるのが好ましい。

## 【0029】

工程(2)において、このようにして調製した測定用試料をフローサイトメー

タに導入し、試料中の染色された細胞のそれぞれについて、散乱光と蛍光を測定する。

本発明でいう散乱光は、一般に市販されるフローサイトメータで測定できる散乱光を指し、前方低角散乱光（受光角度の例として、0～5度未満）、前方高角散乱光（受光角度の例として、5～20度付近）、側方散乱光等をいい、好ましくは前方低角散乱光およびさらなる散乱光には側方散乱光が選ばれる。側方散乱光は細胞の核形態などのような内部情報を反映する。

#### 【0030】

蛍光とは、使用する色素によって好適な受光波長が選択される。蛍光信号は、細胞化学的特性を反映するものである。

フローサイトメータの光源は、特に限定されず、色素の励起に好適な波長の光源が選ばれる。例えば、アルゴンレーザ、He-Neレーザ、赤色半導体レーザ、青色半導体レーザなどが使用される。特に半導体レーザは気体レーザに比べて非常に安価であり、装置コストを大幅に下げることができる。

#### 【0031】

工程（3）において、散乱光ピークの強度差と散乱光幅の差を用いて、凝集細胞および凝集血小板以外のすべての細胞を分類する。具体的には、例えば、X軸に前方散乱光幅、Y軸に前方散乱光ピークをとってスクアットグラムを作成する。スクアットグラム中、例えば図1に示すように、凝集細胞および凝集血小板、ならびに白血球およびゴーストが集団を形成して分布する。このスクアットグラムのすべての細胞から凝集細胞および凝集血小板を除いて、凝集細胞および凝集血小板以外のすべての細胞を分類する。この操作により、凝集細胞および凝集血小板がDNA量異常白血球の領域に出現することが防止され、DNA量異常白血球を正確に分類計数することが可能になる。

#### 【0032】

次に、工程（4）において、工程（3）で分類された成分の散乱光の強度差と蛍光の強度差を用いて、成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球に分類計数する。具体的には、例えば、X軸に蛍光強度、Y軸に前方散乱光強度をとって、上述の凝集血小板および凝集細胞を除いた白血球成分の集団のみでスクアット

タグラムを作成する。スキヤットグラム中、例えば、図2に示すように、成熟白血球、DNA量異常細胞および幼若白血球の各集団と赤血球ゴーストが集団を形成して分布する。そして適当な解析ソフトを用いて各集団の領域を設定し、その領域内に含まれる細胞を分類計数する。このようにして、成熟白血球数、幼若白血球数およびDNA量異常白血球数を得ることができる。

#### 【0033】

さらに、工程（5）において、DNA量異常白血球数と成熟白血球数または幼若白血球数とから、DNA量異常白血球に対する成熟白血球または幼若白血球の割合を算出する。

さらに、工程（6）において、成熟白血球数と幼若白血球数とから、成熟白血球に対する幼若白血球の割合を算出する。

#### 【0034】

さらに、工程（7）において、工程（2）で異なる種類の散乱光をさらに測定し、工程（4）で得られた成熟白血球についての該散乱光と蛍光の強度差を用いてスキヤットグラムを作成する。例えば、X軸に赤蛍光強度、Y軸に側方散乱光強度をとって、図3に示すようなスキヤットグラムを作成する。スキヤットグラム中、少なくとも3つ、例えばリンパ球、単球および顆粒球が集団を形成して分布する。そして適当な解析ソフトを用いて各集団の領域を設定し、その領域内に含まれる細胞を分類計数する。その結果、リンパ球、単球および顆粒球に分類計数することができる。

さらに、工程（8）において、工程（2）で異なる種類の散乱光をさらに測定し、工程（4）で得られた幼若白血球についての該散乱光と蛍光の強度差を用いてスキヤットグラムを作成する。例えば、X軸に赤蛍光強度、Y軸に側方散乱光強度をとって、図3に示すようなスキヤットグラムを作成する。スキヤットグラム中、少なくとも2つ、例えば骨髓系芽球および顆粒球系幼若球が集団を形成して分布する。そして適当な解析ソフトを用いて各集団の領域を設定し、その領域内に含まれる細胞を分類計数する。その結果、骨髓系芽球および顆粒球系幼若球に分類計数することができる。

#### 【0035】

なお、工程(7)と工程(8)は、別々の工程として行っても、同時に行ってもよい。同時に行う際には、工程(4)において、ゴーストを除去した成分の散乱光の強度差と蛍光の強度差を用いてスキャッタグラムを作成すると、図3に示すようなスキャッタグラムが得られ、一度に、成熟白血球および幼若白血球とともに複数個の集団に分類計数することができるので、好ましい。

#### 【0036】

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明には種々の変更、修飾が可能であり、従って、本発明の範囲は以下の実施例によって限定されるものではない。

#### 【0037】

##### 【実施例】

##### 実施例 1

以下の組成の水溶液からなる試薬を調製した。

##### (本法)

ポリオキシエチレン(16)オレイルエーテル	24.0g
N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム	1.5g
DL-メチオニン	20.0g
1N-NaOH	0.3g
NaCl	4.0g
式(VI)の色素	3.0mg
HEPES	12.0g
精製水	1000ml

#### 【0038】

上述の試薬 1ml とリンパ球性白血病患者の血液 33  $\mu$ l を混合し、10秒後にフローサイトメータで前方低角散乱光、側方散乱光、赤蛍光を測定した(光源: 赤色半導体レーザー、波長: 633nm)。

#### 【0039】

##### (DNA量標準測定法)

クエン酸 3Na	100mg
----------	-------

TritonX-100 (和光純薬工業株式会社)	0.2g
プロピジウムアイオダイド (シグマ)	0.2g
RO水	100ml

## 【0040】

上述の試薬1mlと上述の患者の血液100 $\mu$ lを混合し、30分後にフローサイトメータで赤蛍光を測定した(光源:アルゴンイオンレーザー、波長:488nm)。得られた結果を、X軸に前方低角散乱光強度、Y軸に前方低角散乱光ビークをとったスキヤッタグラム(図4)、X軸に赤蛍光強度、Y軸に前方低角散乱光強度をとったスキヤッタグラム(図5)およびX軸に側方散乱光強度、Y軸に赤蛍光強度をとったスキヤッタグラム(図6)に示す。

## 【0041】

上記の血液にメイグリュンワルド染色を施した後、顕微鏡により目視を行った。白血球をリンパ球、単球、顆粒球に分類した。また、上記の血液を用いて、フローサイトメータによるDNA量標準測定法にて、白血球のDNA量を測定した。得られた結果を、表1および図7に示す。

## 【0042】

【表1】

本法と目視の結果

	本法	目視法
リンパ球 (%)	38.3	39.0
単球 (%)	4.5	3.0
顆粒球 (%)	47.7	49.0
骨髄芽球 (%)	2.3	1.5
顆粒球系幼若球 (%)	2.1	1.5
DNA量異常白血球 (%)	5.1	6.0
成熟白血球 : DNA量異常白血球	17.7:1	15.2:1
幼若白血球 : DNA量異常白血球	0.86:1	0.5:1
成熟白血球 : 幼若白血球	20.6:1	30.3:1

## 【0043】

上記の結果、本発明の方法が、DNA量異常白血球と幼若白血球を同時にかつ迅速、簡便に目視と同程度の高精度で測定することが可能であることが示された。

## 【0044】

## 実施例2

以下の組成の水溶液からなる試薬を調製した。

(本法)

ポリオキシエチレン (16) オレイルエーテル	24.0g
N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム	1.5g
DL-メチオニン	20.0g
1N-NaOH	0.3g
NaCl	4.0g
式(VII)の色素	3.0mg
HEPES	12.0g

精製水

1000ml

## 【0045】

上述の試薬1mlと急性骨髄性白血病(AML)患者の血液33 $\mu$ lを混合し、10秒後にフローサイトメータで前方低角散乱光、側方散乱光、赤蛍光を測定した(光源:赤色半導体レーザー、波長:633nm)

## 【0046】

(DNA量標準測定法)

クエン酸3Na

100mg

Triton X-100 (和光純薬工業株式会社)

0.2g

プロビジウムアイオタイド(シグマ)

0.2g

RO水

100ml

## 【0047】

上述の試薬1mlと上述の患者の血液100 $\mu$ lを混合し、30分後にフローサイトメータで赤蛍光を測定した(光源:アルゴンイオンレーザー、波長:488nm)。得られた結果を、X軸に前方低角散乱光幅、Y軸に前方低角散乱光ピークをとったスキャットグラム(図8)、X軸に赤蛍光強度、Y軸に前方低角散乱光強度をとったスキャットグラム(図9)およびX軸に側方散乱光強度、Y軸に赤蛍光強度をとったスキャットグラム(図10)に示した。

## 【0048】

上記の血液にメイグリュンワルド染色を施した後、顕微鏡により目視を行った。白血球をリンパ球、単球、顆粒球に分類した。その結果を表2に示す。

## 【0049】

【表2】

	本法	目視法
リンパ球 (%)	3.6	4.0
単球 (%)	8.6	10.0
顆粒球 (%)	77.0	75.0
骨髓芽球 (%)	3.6	5.0
顆粒球系幼若球 (%)	7.2	6.0
DNA 異常白血球 (%)	0.0	0.0
成熟白血球 : DNA 量異常白血球	89.2:0	89.0:0
幼若白血球 : DNA 量異常白血球	10.8:0	11.0:0
成熟白血球 : 幼若白血球	8.26:1	8.1:1

上記の結果、本発明の方法が、DNA量異常白血球と幼若白血球を同時にかつ迅速、簡便、高精度に測定することが可能であることが示された。

## 【0050】

## 実施例3

実施例1と同様の組成の試薬を用いた。本法試薬1mlと骨髓異形性症候群患者の骨髓液33 $\mu$ lを混合し、7秒後と13秒後にフローサイトメータで前方低角散乱光、側方散乱光、赤蛍光を測定した(光源:赤色半導体レーザー、波長:633nm)。

## 【0051】

## (DNA量標準測定法)

DNA量標準測定法試薬1mlと上述の患者の骨髓液100 $\mu$ lを混合し、30分後にフローサイトメータで赤蛍光を測定した(光源:アルゴンイオンレーザー、波長:488nm)。得られた結果を、X軸に前方低角散乱光幅、Y軸に前方低角散乱光ピークをとった反応時間7秒の場合のスキヤットグラム(図11)、X軸に赤蛍光強度、Y軸に前方低角散乱光強度をとった反応時間7秒の場合のスキヤットグラム(図12)、X軸に側方散乱光強度、Y軸に赤蛍光強度をとった反

応時間7秒の場合のスキヤットグラム(図13)、X軸に前方低角散乱光幅、Y軸に前方低角散乱光ピークをとった反応時間13秒の場合のスキヤットグラム(図14)、X軸に赤蛍光強度、Y軸に前方低角散乱光強度をとった反応時間13秒の場合のスキヤットグラム(図15)、X軸に側方散乱光強度、Y軸に赤蛍光強度をとった反応時間13秒の場合のスキヤットグラム(図16)に示す。

# 【0052】

上記の骨髓液にメイグリュンワルド染色を施した後、顕微鏡により目視を行った。白血球をリンパ球、単球、顆粒球に分類した。また、上記の血液を用いて、フローサイトメータによるDNA量標準測定法にて、白血球のDNA量を測定した。その結果を表3に示す。表4と図17に反応時間13秒の本発明の方法とDNA量標準測定法の結果を示す。

【表3】

	本法(反応時間7秒)	目視法
リンパ球(%)	9.5	8
単球(%)	16.4	18
顆粒球(%)	6.8	9
骨髓芽球(%)	2.3	1
顆粒球系幼若球(%)	65.0	51
DNA量異常白血球(%)	0	13
成熟白血球:DNA量異常白血球	32.7:0	2.7:1
幼若白血球:DNA量異常白血球	67.3:0	4:1
成熟白血球:幼若白血球	0.49:1	0.67:1

# 【0053】

【表4】

	本法(反応時間13秒) (%)	DNA量標準測定法 (%)
DNA量異常白血球	11	13
正常(DNA量)白血球	89	87

## 【0054】

以上より反応時間7秒のときは成熟白血球、幼若白血球を正確に測定することができ、反応時間13秒にすることにより、さらに幼若白血球に含まれるDNA量異常白血球を検出することができる。

## 【0055】

## 【発明の効果】

上記に示したように、本発明により、DNA量異常白血球を迅速かつ簡便に測定することが可能となった。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の方法によって分類計数される各細胞の出願位置を示す概念図である。

【図2】 本発明の方法によって分類計数される各細胞の出願位置を示す概念図である。

【図3】 本発明の方法によって分類計数される各細胞の出願位置を示す概念図である。

【図4】 X軸に前方低角散乱光幅、Y軸に前方低角散乱光ピークをとった実施例1のスキヤットグラムである。

【図5】 X軸に赤蛍光強度、Y軸に前方低角散乱光強度をとった実施例1のスキヤットグラムである。

【図6】 X軸に側方散乱光強度、Y軸に赤蛍光強度をとった実施例1のスキヤットグラムである。

【図7】 本法とDNA量標準測定法の結果を示す。

【図 8】 X 軸に前方低角散乱光幅、Y 軸に前方低角散乱光ピークをとった実施例 2 のスキヤッタグラムである。

【図 9】 X 軸に赤蛍光強度、Y 軸に前方低角散乱光強度をとった実施例 2 のスキヤッタグラムである。

【図 10】 X 軸に側方散乱光強度、Y 軸に赤蛍光強度をとった実施例 2 のスキヤッタグラムである。

【図 11】 X 軸に前方低角散乱光幅、Y 軸に前方低角散乱光ピークをとった実施例 3 の反応時間 7 秒の場合のスキヤッタグラムである。

【図 12】 X 軸に赤蛍光強度、Y 軸に前方低角散乱光強度をとった実施例 3 の反応時間 7 秒の場合のスキヤッタグラムである。

【図 13】 X 軸に側方散乱光強度、Y 軸に赤蛍光強度をとった実施例 3 の反応時間 7 秒の場合のスキヤッタグラムである。

【図 14】 X 軸に前方低角散乱光幅、Y 軸に前方低角散乱光ピークをとった実施例 3 の反応時間 13 秒の場合のスキヤッタグラムである。

【図 15】 X 軸に赤蛍光強度、Y 軸に前方低角散乱光強度をとった実施例 3 の反応時間 13 秒の場合のスキヤッタグラムである。

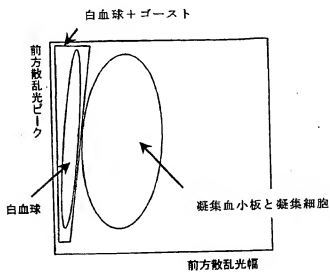
【図 16】 X 軸に側方散乱光強度、Y 軸に赤蛍光強度をとった実施例 3 の反応時間 13 秒の場合のスキヤッタグラムである。

【図 17】 反応時間 13 秒の本発明の方法と DNA 量標準測定法の結果を示す図である。

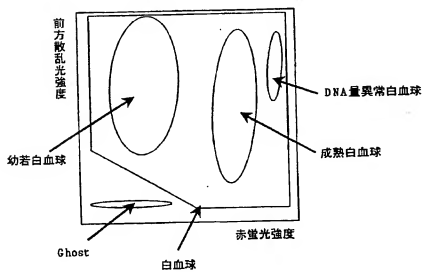
【書類名】

図面

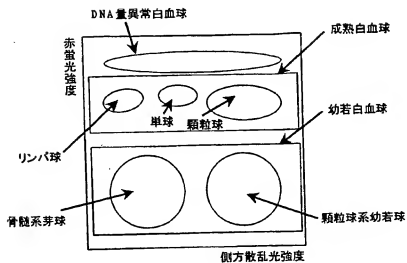
【図1】



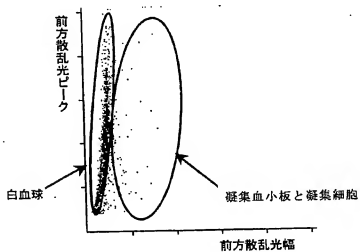
【図2】



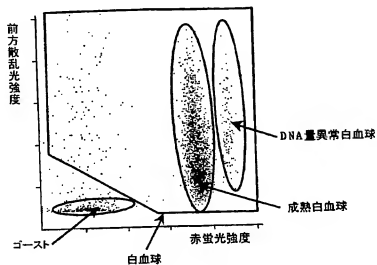
【図3】



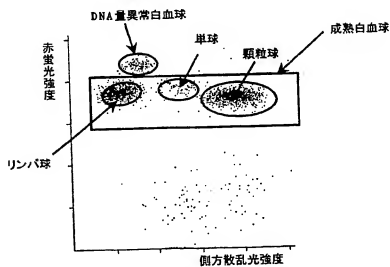
【図4】



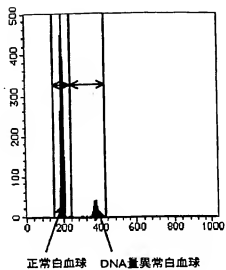
【図5】



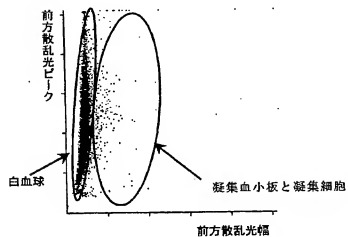
【図6】



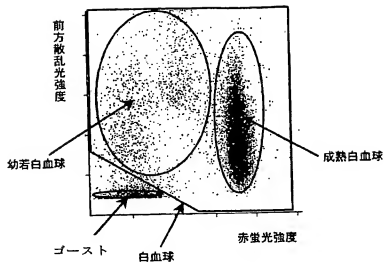
【図 7】



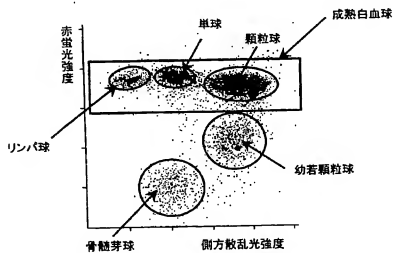
【図 8】



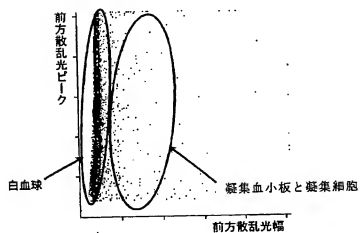
【図9】



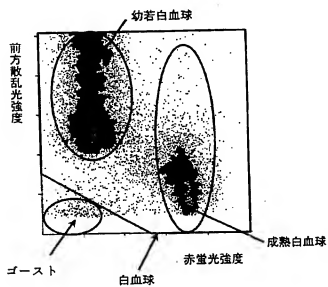
【図10】



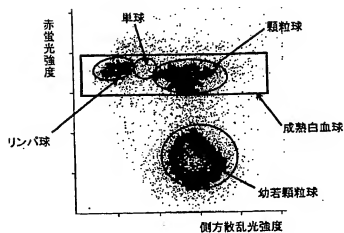
【図11】



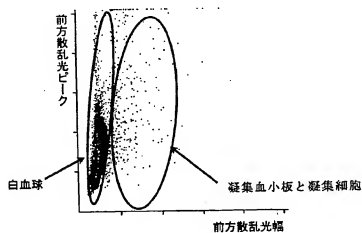
【図12】



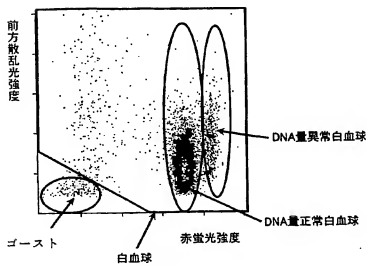
【図13】



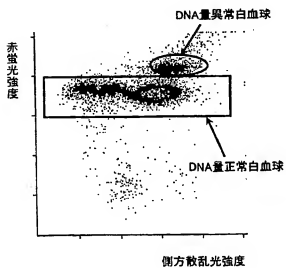
【図14】



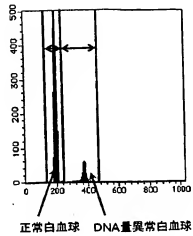
【図15】



【図16】



【図17】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 DNA量異常白血球を測定するための迅速かつ簡便な方法の提供。

【解決手段】 (1) 血液学的試料を溶血剤と処理して赤血球を溶解させ、幼若白血球以外の白血球に損傷を与え、かつ得られた試料中の細胞を、少なくとも成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球との間に蛍光強度の差異を生じうる蛍光色素で染色する工程、

(2) 染色された細胞を含む試料をフローサイトメータに導入して、各細胞について、散乱光と、蛍光とを測定する工程、

(3) 散乱光ピークの強度差と散乱光幅の差を利用して、凝集細胞および凝集血小板以外の全ての細胞を分類する工程、

(4) 工程(3)で分類された細胞の散乱光の強度差と蛍光の強度差とを利用して、成熟白血球、DNA量異常白血球および幼若白血球を分類計数する工程からなるDNA量異常白血球の分類計数方法により提供される。

【選択図】 図2

特願2002-183259

出願人履歴情報

識別番号

[390014960]

1. 変更年月日  
[変更理由]

1998年10月 7日

名称変更

住所変更

住所  
氏名

神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号  
シスメックス株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINE(S) OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**